

ウイルス性プロテアーゼ阻害剤の創製を目指す抗体 可変領域のタンパク質工学的研究

著者	葛西 信弘
号	2841
発行年	2001
URL	http://hdl.handle.net/10097/8114

氏 名	葛 西 信 弘
授 与 学 位	博士(工学)
学 位 授 与 年 月 日	平成 14 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 根 拠 法 規	学位規則第 4 条第 1 項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 生物工学専攻
学 位 論 文 題 目	ウイルス性プロテアーゼ阻害剤の創製を目指す抗体可変領域のタンパク質工学的研究
指 導 教 官	東北大学教授 熊谷 泉
論 文 審 査 委 員	主査 東北大学教授 熊谷 泉 東北大学教授 西野 徳三 東北大学教授 野澤 庸則

論 文 内 容 要 旨

第一章 序論

公衆衛生の改善や急速に発展し今もなお進歩し続ける医用技術は前世紀後半における数多くの致死的な感染症の撲滅をもたらしたが、抗生物質のような特効薬が存在しないウイルス性疾患の克服にはウイルス粒子複製を強力に抑制できるウイルス特異的な薬剤の開発が必要不可欠である。C 型肝炎ウイルス(HCV)は感染者数が現在全人口の約 2%にも及び、慢性的な感染によって肝ガンや肝硬変などの重篤な症状へと進行する恐れのあることから、抜本的かつ汎用可能な治療薬の開発が殊に切望されている。HCV のゲノムから直接翻訳される前駆体タンパク質内の NS3 ドメイン N 末端側約 180 残基に存在する NS3 プロテアーゼはウイルス複製機構においてウイルスタンパク質の活性化を司る重要な分子であることから、その阻害剤は高特異性の抗 HCV 薬となりうる事が期待されている。生体内の免疫系にて侵入した異物を抗原として認識・排除する働きを持つ抗体分子には多種多様な分子に対する結合可能性が潜在しているため、阻害剤の候補として挙げられる。Ueno らによって単離されたモノクローナル抗体 (mAb) 8D4 は NS3 プロテアーゼの酵素活性を阻害する唯一の mAb であり、またペプチドライブラリーを用いたエピトープマッピングの結果、NS3 プロテアーゼの活性残基の 1 つである Asp81 を含むループ領域を認識していることが示唆されている。本研究は 8D4 の NS3 プロテアーゼ活性阻害能の詳細を解明するためにポリペプチドレベルおよびアミノ酸レベルでの多角的な検討を行い、得られた情報を利用したアミノ酸配列改変によって 8D4 の阻害活性を向上させることでより効果的な阻害剤の創製を行なうことをその目的とした。

第二章 モノクローナル抗体 8D4 Fv の遺伝子工学的作製と機能評価

この章では 8D4 の組換え体を H・L 両鎖の可変領域 (以下各々 VH・VL と表記) を非共有結合的にヘテロダイマー化させた Fv (Fragment of variable region) として獲得可能な発現系の構築を行なった。まず 8D4 IgG 産生ハイブリドーマから抽出した mRNA を用いた逆転写反応にて取得した cDNA を鋳型とした PCR を行い、8D4 可変領域を含む遺伝子を特異的に増幅させ、適当な制限酵素消化・ライゲーション反応を経て両可変領

域用の発現ベクターpUT-8D4-VH-VL を各々別個に作製した。発現誘導によって宿主大腸菌内に不溶性顆粒として蓄積した 8D4 VH-VL はそれぞれ変性剤を含む緩衝液に溶解させた後、C 末端側に融合発現させた His 6 残基を利用した金属キレートアフィニティークロマトグラフィーにより単一に精製し、等モル高濃度下(各々 20 μ M)で混合させた状態で段階透析法による巻き戻し反応を行なうことで、立体構造を復元させた 8D4 Fv が得られた。作製した Fv について NS3 プロテアーゼを用いた *in vitro* における阻害活性測定を行なったところ約 80%の阻害活性を示し、その 50%阻害濃度 (IC₅₀ 値)は 65.3nM であった。次に NS3 プロテアーゼを固定したセンサーを用いた表面プラズモン (SPR) 法による結合活性測定を行なった結果、Fv は親抗体である IgG とほぼ同程度の活性を有していることが示された。

第三章 モノクローナル抗体 8D4 相補性決定領域 (CDR) 由来ペプチドの酵素阻害活性

抗体分子の特異性・親和性は共通の枠組み構造からループ状に突出した 6 つの CDR ループに集約されることが一般的に知られており、いくつかの抗体の CDR の配列を含むペプチドは親抗体と同様の特異性を有しかつ十分な親和性を保持していることが確認されている。8D4 のように、その機能を作用させるためにはウイルス感染細胞への輸送が必要なクローンについては、複雑・不安定・抗原性といったタンパク質性の抗体分子が持つ欠点を回避しうる CDR 由来ペプチドへの最小化を試みることは創薬上重要である。また抗体のパラトープを 6 つの CDR ループに分割して各々について抗原認識能について評価することで、8D4 の阻害活性に重要な領域を限定し、その情報をアミノ酸改変による機能向上に利用できる可能性もある。そこで 8D4 の 6 つの CDR 配列を含むペプチドを合成してそれらの阻害活性を評価したところ、とりわけ H 鎖 CDR1 (CDR-H1) 由来のペプチドが IC₅₀ = 35.7 [μ M]という比較的強い阻害活性を有していることがわかった。

天然の抗体分子の構造では CDR の両端はほぼ固定されているといえ、故にそのループ状構造はある程度の拘束を受けていると考えることができる。CDR-H1 ペプチドの両端に導入した Cys 残基による分子内ジスルフィド結合で環状化させることで抗体分子中のループ構造を模倣させた CDR-H1 ペプチドではさらに阻害活性が向上したことから、CDR-H1 ループが 8D4 における阻害活性の発現に決定的に重要な領域であることが示された。

第四章 阻害能に重要な残基の同定を目指した Ala 置換変異体の機能解析

アミノ酸配列の改変によって 8D4 の阻害活性を向上させるためには、その抗原認識能について重要である領域や残基の同定が必要不可欠である。注目している領域のアミノ酸残基に対して Ala に置換した 1 置換変異体を系統的に多数作製し、野生型と変異体との機能上の変化を観測する「Alanine-scanning 法」は構造情報が未知のタンパク質について、構造的な要素と分子機能との相関を解明する手法の 1 つである。配列情報を利用して 8D4 の機能に重要であると予想される VH CDR 内およびその周辺の 10 残基を選択し、Ala に置換した変異体 Fv の作製を野生型と同様の手法で行なった。作製した変異体の阻害活性測定を行なったところ、CDR-H1 に含まれる残基である Tyr32・Val33・Ile35 の Ala 変異体において野生型よりも低活性であることが確認された。この傾向は SPR 法による結合活性測定から導出された速度定数にも反映されており、顕著な阻害

活性の低下が見られた Tyr32 Ala 変異体 (HY32A) において結合平衡定数 K_d が野生型の 45% にまで低下していることがわかった。従って Tyr32 の側鎖は CDR-H1 の中でも阻害活性に特に重要であるといえる。

第五章 H 鎖 CDR1 (CDR-H1) への変異導入による阻害能の増強

8D4 CDR-H1 に強い阻害活性が存在し、かつ Ala 置換変異体の阻害活性評価から Tyr32・Val33・Ile35 の側鎖が阻害活性に重要であることが明らかになったことにより、8D4 の阻害活性に関して CDR-H1 が特に主要な役割を果たしていることが示唆される。他の研究グループによって発見または設計されたペプチド阻害剤と 8D4 CDR-H1 の配列比較を行ったところ、8D4 CDR-H1 の Asp31・Tyr32・Val33 は阻害活性に有効な残基であるが Leu34 や Ile35 はあまり効果的ではないと考えられ、この両残基に対して適当なアミノ酸置換を行なう (Leu34 → Ile・Glu, Ile35 → Leu・Glu) ことで阻害活性が向上する可能性が示唆された。7 種の 34・35 位変異体 Fv を野生型と同様の手法で作製しそれらの阻害活性測定を行なったところ、34・35 位の両方を Glu に変換した変異体 EE は $IC_{50} = 53.4[nM]$ を示し、8D4 Fv の阻害活性を約 20% 向上させることに成功した。また基質ペプチドへの模倣によって阻害能が向上していることから、CDR-H1 とプロテアーゼの基質結合部位との相互作用の強化が 8D4 の阻害活性向上に対して好ましい影響を与えていることが明らかとなった。

第六章 総括

本章では本研究の総括にあたり、NS3 プロテアーゼ阻害剤開発における今後の課題や抗 HCV 治療薬の現状と将来についてまとめている。本研究では阻害剤として有益な特性を有する mAb 8D4 を基に、CDR ペプチド・変異体解析による阻害能とアミノ酸配列との相関の詳解および配列改変による阻害活性の向上を実現することができた。

論文審査結果の要旨

公衆衛生の改善や、急速に発展し今もなお進歩し続ける医用技術は、前世紀後半における数多くの致死的な感染症の撲滅をもたらしたが、抗生物質のような特効薬が存在しないウイルス性疾患の克服にはウイルス粒子の複製を強力に抑制できるウイルス特異的な薬剤の開発が必要不可欠である。C型肝炎ウイルス(HCV)は感染者数が現在全人口の約 2%にも及び、慢性的な感染によって肝ガンや肝硬変などの重篤な症状へと進行する恐れのあることから、抜本的かつ汎用可能な治療薬の開発が殊に切望されている。本学位論文はHCVの複製機構に重要な分子であるHCV NS3プロテアーゼに対する活性阻害能を有するモノクローナル抗体である 8D4 を基に、タンパク質工学的手法を用いてその機能を詳細に解析し、得られた情報を利用して行なわれたアミノ酸配列改変により、高い阻害活性を保持した抗体分子を作製したもので、全文 6 章にて構成されている。

第 1 章は序論であり、本研究の背景および目的について記載されている。

第 2 章では 8D4 の組換え抗体を H 鎖および L 鎖の可変領域を非共有結合的に 2 量体化させた Fv という分子形態で獲得できる大腸菌を利用した発現・調製系の構築を行なっている。各々別個に発現・精製された両可変領域を等モル高濃度下(各々 20 μ M)で混合させた状態で段階透析法による巻き戻し反応を行なうことで、親抗体と同等の阻害・結合活性を保持した組換え抗体 8D4 Fv が得られることを示した。

第 3 章では 8D4 の抗原結合部位を形成する相補性決定領域(CDR)の配列を有するペプチドを作製し、それらの阻害活性の評価を行なっている。6つの CDR ペプチドのうち、H 鎖 CDR1(CDR-H1)が特に強い阻害活性を示し、両端に導入した Cys 残基による分子内ジスルフィド結合で環状化させることで抗体分子中のループ構造を模倣させた CDR-H1 ペプチドではさらに阻害活性が向上したことから、CDR-H1 が 8D4 における阻害活性の発現に決定的に重要な領域であることを明らかにした。

第 4 章では 8D4 の機能に影響を及ぼしていると予想される CDR 残基を Ala に置換した変異体 Fv 10 種を作製し、それらの阻害活性および結合活性の評価を行なっている。Ala 置換によって両活性の顕著な低下が確認された CDR-H1 内の Tyr32 について、この残基側鎖が CDR-H1 の中でも阻害活性に特に重要であると結論づけている。

第 5 章では上述の結果を基に阻害活性の創出に必要な不可欠である CDR-H1 に対するアミノ酸配列改変による阻害活性の強化を試みている。他のペプチド性阻害剤との配列比較から阻害活性への寄与が小さいことが予想された 34・35 位の両者を Glu に置換することで、基質ペプチドへの相同性を高めた CDR-H1 変異体において阻害活性の向上が実現できたことから、8D4 の阻害能向上に関して、NS3 プロテアーゼの基質結合部位と CDR-H1 との相互作用を強化することの重要性を見いだしている。

第 6 章は本研究の総括である。

以上本論文ではウイルス特異的な治療薬開発における主要な標的分子であるウイルス性プロテアーゼに対する阻害剤としての有利な特性を保持している抗体分子について、変異体解析等による阻害能とアミノ酸配列との相関の詳解およびそれに基づいた配列改変による分子機能の向上を実現しており、抗体分子をモデルとするタンパク質工学の進展に寄与するところが少なくない。

よって本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。